昆 虫 学 报 Acta Entomologica Sinica，October 2002，45（5）：571 – 577 ISSN 0454-6296

我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列测定与分析

宋社吾[1]，赵彤言[1]，董言德[1]，蒋书楠[2]，陆宝麟[1]

（1. 军事医学科学院微生物流行病研究所，北京 100071；2. 西南农业大学植物保护系，重庆 400716）

摘要：测定了我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列。核苷酸和氨基酸的同源性及系统关系分析表明，我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊中 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列与 *Pip* 组其它株的核苷酸及氨基酸同源性分别为 98% ~ 100% 和 97% ~ 100%，属 B 大组 *Wolbachia* 中的 *Pip* 组。

关键词：尖音库蚊复合组；白纹伊蚊；*Wolbachia*；*wsp*；序列分析

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）05-0571-07

Sequencing and sequence analysis of the *wsp* gene of *Wolbachia* in Chinese mosquitoes

SONG She-Wu[1]，ZHAO Tong-Yan[1]，DONG Yan-De[1]，JIANG Shu-Nan[2]，LU Bao-Lin[1]（1. Institute of Microbiology and Epidemiology，Academy of Military Medical Sciences，Beijing 100071，China；2. Department of Plant Protection，Southwest Agricultural University，Chongqing 400716，China）

Abstract: Sequencing of the *wsp* gene in *Wolbachia* infecting mosquitoes of the *Culex pipiens* complex and *Aedes albopictus* was perfomed. The homology of nucletide and amino acids between strains infecting *Cx*. *pipiens* complex and *Ae*. *albopictus* in China and other strains of *Pip* group was 98% – 100% and 97% – 100%，respectively. The strains of *Wolbachia* which infect the *Cx*. *pipiens* complex and *Ae*. *albopictus* in China belong to the *Pip* group of the *Wolbachia* B-supergroup. These strains may induce cytoplasmic incompatibility in there hosts.

Key words: *Culex pipiens* complex；*Aedes albopictus*；*Wolbachia*；*wsp*；sequence analysis

昆虫共生微生物 *Wolbachia* 由于其可能与重要的进化过程有关以及在媒介生物的遗传防治和作为外源基因的载体等领域的应用前景，近年来引起国际昆虫学界和媒介生物学界的广泛关注和兴趣。该类微生物通过诱导宿主间杂交的胞质不融合（cytoplasmic incompatibility，CI），诱导单性生殖（parthenogenesis，PI）和雌性化（feminization）等机制改变和影响着其宿主的繁殖（龚鹏等，2002）。人们从 20 世纪 20 年代就开始认识和研究该类微生物，但是由于大多数立克次体不能在宿主细胞体外培养，使其研究的深入受到限制（Werren，1995；1997）。上个世纪末，分子生物学方法的应用极大地促进了 *Wolbachia* 的研究，已有多个基因序列被应用到该微生物的系统发育中。应用 16S rDNA、23S rDNA 以及 *ftsZ* 等基因的序列分析，弄清了各个 *Wolbachia* 株的系统发育关系，发现在不同宿主的繁殖中表现出不同的操作机制的各个 *Wolbachia* 株均属于 Proteobacteria 的 α 亚群；并将已知的各个 *Wolbachia* 株划分为 A 和 B 二个大组。但 16S rDNA 等基因的进化速度太慢，因而不能提供足够的信息来解决表现出不同繁殖改变的各个 *Wolbachia* 株之间的关系。目前一种编码 *Wolbahcia* 主要表面蛋白的基因——*wsp* 基因被认为是在所有已知的 *Wolbachia* 基因中进化最快的，并建立了依据其基因序列对各个 *Wolbachia* 株进行 PCR 分类检测的方法和系统发育分析，将节肢动物体内共生的 *Wolbachia* 分为 A 和 B

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39770674）

第一作者简介：宋社吾，男，1965 年 4 月生，博士，研究方向为病原微生物。现工作单位：安徽省生物研究所。E-mail：songshewu@163.net

收稿日期 Received：2001-04-09；接受日期 Accepted：2001-10-29

两大组（supergroup）以及大组下的组（group）（Braig *et al.*，1998；Zhou *et al.*，1998）。我们通过 PCR 检测的方法发现在我国的蚊虫体内普遍存在有 *Wolbachia* 的感染（宋社吾等，2002），通过对我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列的测定确定其分类地位，为进一步探讨 *Wolbachia* 的感染与我国尖音库蚊复合组蚊虫杂交的胞质不融合现象（赵彤言等，1998）的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 蚊种及来源

采用本研究室饲养的下列蚊种：库蚊属尖音库蚊复合组 4 个实验种群：淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* 北京株，致倦库蚊 *Cx. pipiens quinquefasciatus* 广州株，尖音库蚊 *Cx. pipiens pipiens* 乌鲁木齐株和骚扰库蚊 *Cx. pipiens molestus* 北京株；伊蚊属白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 北京株和江苏株。

1.2 蚊虫总 DNA 的制备

解剖多只蚊虫的卵巢或精巢（或整只蚊虫），置于装有 300 μL DNA 提取裂解液（100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，50 mmol/L NaCl，50 mmol/L EDTA，1% SDS，0.15 mmol/L 精胺，0.5 mmol/L 亚精胺）的离心管中（整只蚊虫用玻璃棒匀浆），加入 2 μL 蛋白质 K 溶液（20 mg/mL），50℃水浴 2 h 以上。用水饱和酚（pH 8.0）和氯仿-异戊醇（24∶1）抽提 2 次，离心（9 000 r/min，10 min）上清液中加入 0.2 倍体积的乙酸铵溶液（10 mol/L）和 2 倍体积的无水乙醇，－20 ℃保存 2 h 以上离心，沉淀用冷 75% 乙醇洗涤后离心，沉淀晾干后溶于 10 μL 双蒸灭菌水中，4℃保存。

1.3 蚊虫体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段的 PCR 扩增

使用一对通用的特异性引物 81F：5′-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC 和 691R：5′-AAAAATTAAACGCTACTCCA。可以从所有已知的 *Wolbachia* 株中扩增出 590～632 bp 的目的片段（Zhou *et al.*，1998）。扩增体积为 20 μL，包括 13.5 μL ddH_2O，2 μL 10×buffer，2 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，0.5 μL dNTPs（10 mmol/L each），0.5 μL 20 μmol/L 上游和下游引物以及 1U Taq DNA 聚合酶。扩增条件：95℃预变性 3 min；94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min 扩增 35 个循环；最后 72℃延伸 7 min。取以上 PCR 产物 10 μL，用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

1.4 序列测定与分析

每个实验种群测 3 个样本，尖音库蚊复合组蚊虫共测 12 个样本，白纹伊蚊共测 6 个样本。采用克隆测序方法，PCR 产物通过 pGEM-T Vector System（Promaga）与 pGEM-T 载体连接，转化感受态宿主菌（XL-1），通过蓝白斑筛选和特异 PCR 鉴定重组质粒。序列测定采用四色荧光标记双脱氧链终止法，ABI 377 型（Perkin Elmer）自动测序仪测序，测序试剂为 ABI PRISM BigDye 试剂盒及 Ampli Taq DNA 聚合酶（Perkin Elmer）。序列分析，DNA 序列检索和同源性比较利用“BLAST”工具（NCBI 站点）。所得的序列用支序系统学 PHYLIP 3.5c 软件包（Felsenstein，1993）首先进行 500 次的自导复制（Bootstrap replication），用 DNADIST 程序根据 Kimura's 2-parameter 模型计算个体间遗传距离，在 NEIGHBOR 程序中用 UPGMA 法获得聚类图，最后在 CONSENSE 程序中形成合意树。另外，利用 BioEdit 进行氨基酸翻译，CLUSTAL（Thompson *et al.*，1994）进行同源性分析比较。

2 结果

2.1 我国尖音库蚊复合组以及白纹伊蚊蚊虫体内 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列

测序结果可以得知，使用 81F 和 691R 一对 *Wolbachia* 的通用引物从我国尖音库蚊复合组的 4 个亚种实验室种群中扩增出的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因片段的长度均为 602 bp。同样的引物在我国白纹伊蚊的 2 个实验室种群中扩增出的 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因片段也为 602 bp。

尖音库蚊复合组蚊虫中扩增出的 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段序列中，分别有 3 个样本 4 处的 4 个碱基有变化。在致倦库蚊的 1 份样本中，第 239 碱基位有 T 和 C 的置换。在尖音库蚊的 1 份样本中，第 374 碱基位有 A 和 C 颠换；第 474 碱基位有 A 和 G 的置换。在骚扰库蚊的 1 份样本中，第 404 碱基位有 T 和 A 的颠换。除此以外，4 个亚种实验室种群中测得 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列所有样本间完全一致。白纹伊蚊 2 个地理株实验室种群中测得的 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因的序列所有样本间完全一致。

2.2 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列比较与同源性分析

在所测我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列中，库蚊与伊蚊的 *wsp* 基因序列之间 9 处核苷酸有改变，包括有碱基的置换和颠换（图 1）。

图 1 中还列出了 *Wolbachia* 的二大组对照株的序列。一个是 B 大组 *Pip* 组中的 *w*Ma 株［宿主为 *Drosophila simulans*（Mauritiana）］，另一个为 A 大组的 *w*Ri 株［宿主为 *Drosophila simulans*（Riverside）］。本研究中所测的我国尖音库蚊和白纹伊蚊体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列与 *w*Ma 株的 *wsp* 基因序列在所比的核苷酸范围内分别各有 5 处改变；与 *w*Ri 株分别有 130 和 131 处改变。

将测得的序列利用 BLAST 分析程序与 GenBank 里注册的序列进行最大同源性比较。再利用相关的分析软件进行同源性比较分析得表 1。我国尖音库蚊和伊蚊体内的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列与 B 大组中 *Pip* 组的其他株（*w*Ma、*w*Pip 和 *w*AlbB 等）的同源性均为 98.21% ~ 100.00%，其中与 *Pip* 组标准种 *w*Pip 的同源性分别为 99.82%（仅有 1 个核苷酸不同，而且是由于网上的 *w*Pip 株序列中有 1 个 r 所致）和 98.21%；与 B 大组的另外组各株（*w*Con、*w*Ori 和 *w*Dei）的同源性为 51.81% ~ 67.03%；而与其余的 A 大组各株的同源性为 52.33% ~ 78.34%（表 1）。

对所测得的我国库蚊和伊蚊体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因序列以及已知的其他株序列利用 PHYLIP 软件进行聚类分析得到 UPGMA 聚类图（图 2）。UPGMA 聚类图中，我国库蚊体内感染的 *Wolbachia* 株 *wsp*1 与 *w*Pip 株归在 1 个组内，伊蚊体内感染的 *Wolbachia* 株 *wsp*2 与 *w*AlbB 株归在 1 个组内。它们统归为 B 大组 *Wolbachia* 的 *Pip* 组类群中，而与 A 大组以及 B 大组的其他组株独立形成各自的类群。
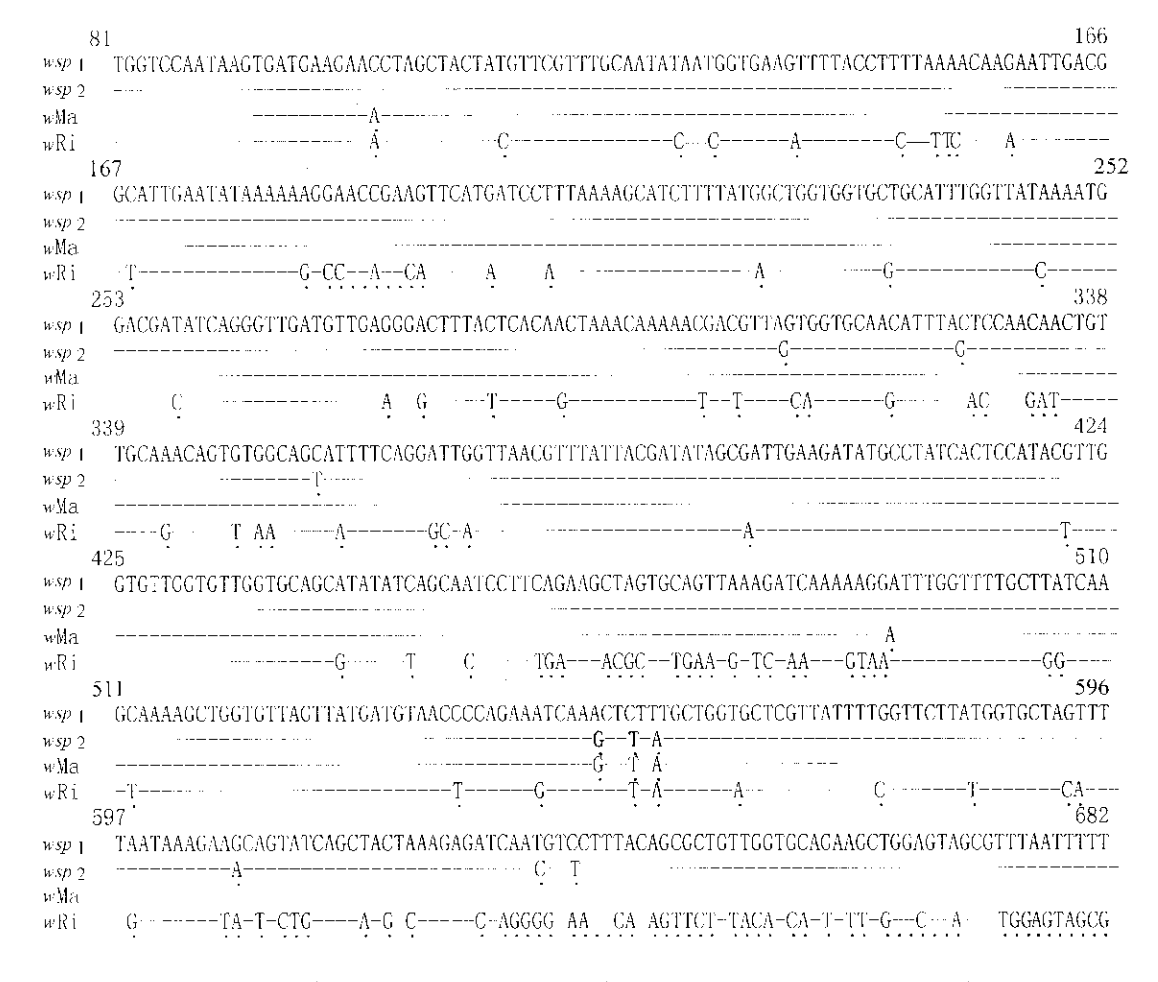


图 1 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因序列及与其他 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因序列的比较

Fig. 1 The *wsp* gene sequences of *Wolbachia* in Chinese mosquitoes and their comparison with those of other *Wolbachia* strains

*wsp*1：尖音库蚊复合组中 *Wolbachia* 株（*Cx. pipiens* complex）；*wsp*2：白纹伊蚊中 *Wolbachia* 株（*Ae. albopictus*）；*w*Ma：*Drosophila simulans*（Mauritiana）；*w*Ri：*Drosophila simulans*（Riverside）；相同的碱基以“ – ”表示（–：same）.
下同 The same for the following table and figures

表1 我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因与其他株对应位置序列同源性比较结果

Table 1 Comparison of the homology of sequences of the *wsp* gene of *Wolbachia* among *wsp*1 (isolated from infected mosquitoes of the *Cx. pipiens* complex) and *wsp*2 (isolated from infected *Ae. albopictus*) and other *Wolbachia* strains

Wolbachia 株 (Strains)	*wsp*1（库蚊 *Cx. pipiens* complex）			*wsp*2（伊蚊 *Ae. albopictus*）			注册号 (Accession number)
	比较核苷酸数目 (Number of compared nucleotides)	相同核苷酸数目 (Number of identical nucleotides)	核苷酸同源性（%） (Homology of nucleotide)	比较核苷酸数目 (Number of compared nucleotides)	相同核苷酸数目 (Number of identical nucleotides)	核苷酸同源性（%） (Homology of nucleotide)	
*wsp*1 (602 bp)	—	—	—	602	593	98.50	AF216859
*wsp*2 (602 bp)	602	593	98.50	—	—	—	AF216860
B大组 B supergroup							
*w*Ma (642 bp)	590	584	98.98	590	581	98.47	AF020069
*w*Pip (558 bp)	558	557	99.82	558	548	98.21	AF020060
*w*AlbB (558 bp)	558	549	98.39	558	558	100.00	AF020059
*w*Con (555 bp)	555	372	67.03	555	368	66.31	AF020083
*w*Ori (552 bp)	552	286	51.81	552	286	51.81	AF020085
*w*Dei (555 bp)	555	351	63.24	555	349	62.88	AF020084
A大组 A supergroup							
*w*Ri (1075 bp)	602	471	78.24	602	470	78.07	AF020070
*w*Cen (564 bp)	564	422	74.82	564	418	74.11	AF020078
*w*AlbA (655 bp)	581	319	54.91	581	322	55.42	AF020058
*w*Uni (644 bp)	591	463	78.34	591	461	78.00	AF020071
*w*Ha (779 bp)	602	317	52.66	602	315	52.33	AF020068
*w*Aus (619 bp)	566	345	60.95	566	345	60.95	AF020077
*w*Pap (564 bp)	564	323	57.27	564	324	57.45	AF020082
*w*MelCS (674 bp)	594	335	56.40	594	337	56.73	AF020064

2.3 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因编码的氨基酸分析

将我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因翻译成氨基酸后，比较可以发现在我国两种蚊虫中发现的两种 *Wolbachia* 株它们的 *wsp* 基因编码的表面蛋白氨基酸序列有5处改变。对我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊蚊虫体内 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因编码的氨基酸序列以及其他部分 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因编码的氨基酸序列进行 CLUSTAL 排列比较，在不同组别的 *Wolbachia* 株氨基酸序列之间，存在有一定区域的差异（图3）。

氨基酸序列同源性比较结果表明，我国尖音库蚊复合组蚊虫体内 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因编码的氨基酸序列与B大组中 *Pip* 组其他株的同源性为97%～99%，其中与 *w*Pip 株（宿主为致倦库蚊，引起CI）仅有一个氨基酸不同，而且是由于网上的 *w*Pip 株在第194位氨基酸密码子上出现了一个不能识别的 rgt，从而出现了无效翻译（X）。与B大组另外组各株的同源性为34%～54%。与A大组其他株的同源性为35%～71%。

我国白纹伊蚊体内 *Wolbachia* 株 *wsp* 基因编码的氨基酸序列与B大组中 *Pip* 组其他株的同源性为97%～100%，其中与 *w*AlbB 株（宿主为白纹伊蚊，引起CI）的氨基酸序列完全相同。与B大组另外组各株的同源性分别为34%～52%。与A大组其他株的同源性为36%～71%。

3 讨论

在所有所测我国尖音库蚊复合组蚊虫体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因片段序列样本中，分别有3个样本4处的4个碱基有变化，而同一实验种群中其余2个样本没有变化，即除了以上4处独自的变化以外，样本间序列完全一致。该4处的碱基变化可能是由于 Taq 酶的错掺所引起的。

Wolbachia 是存在于节肢动物体内最为丰富的宿主微生物之一（Werren，1997）。对我国蚊虫的检测结果表明，昆虫共生微生物 *Wolbachia* 普遍存在于我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊的蚊虫内（宋社吾等，2002），提示该微生物的存在可能与这二种蚊虫的杂交不融合现象有关联（赵彤言等，1998）。本研究通过对我国尖音库蚊复合组和白纹伊蚊蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因编码的核苷酸及其翻译的氨基酸分析，可以看出它们分别与具有诱导 CI 现象能力的 B 大组中 *Pip* 组的 *w*Pip 和 *w*AlbB 株十分相近或完全相同，提示它们可能为相近或相同的株。因而，在诱导其相应的宿主间杂交不融合现象（CI）中可能具有同样的功能，如同甘波谊等已在中国三种稻飞虱中发现了诱导 CI 的 *Wolbachia* 感染一样（甘波谊等，2002）。但这需要进一步的杂交和抗生素试验来加以证实，该方面的试验结果我们将另文报道。

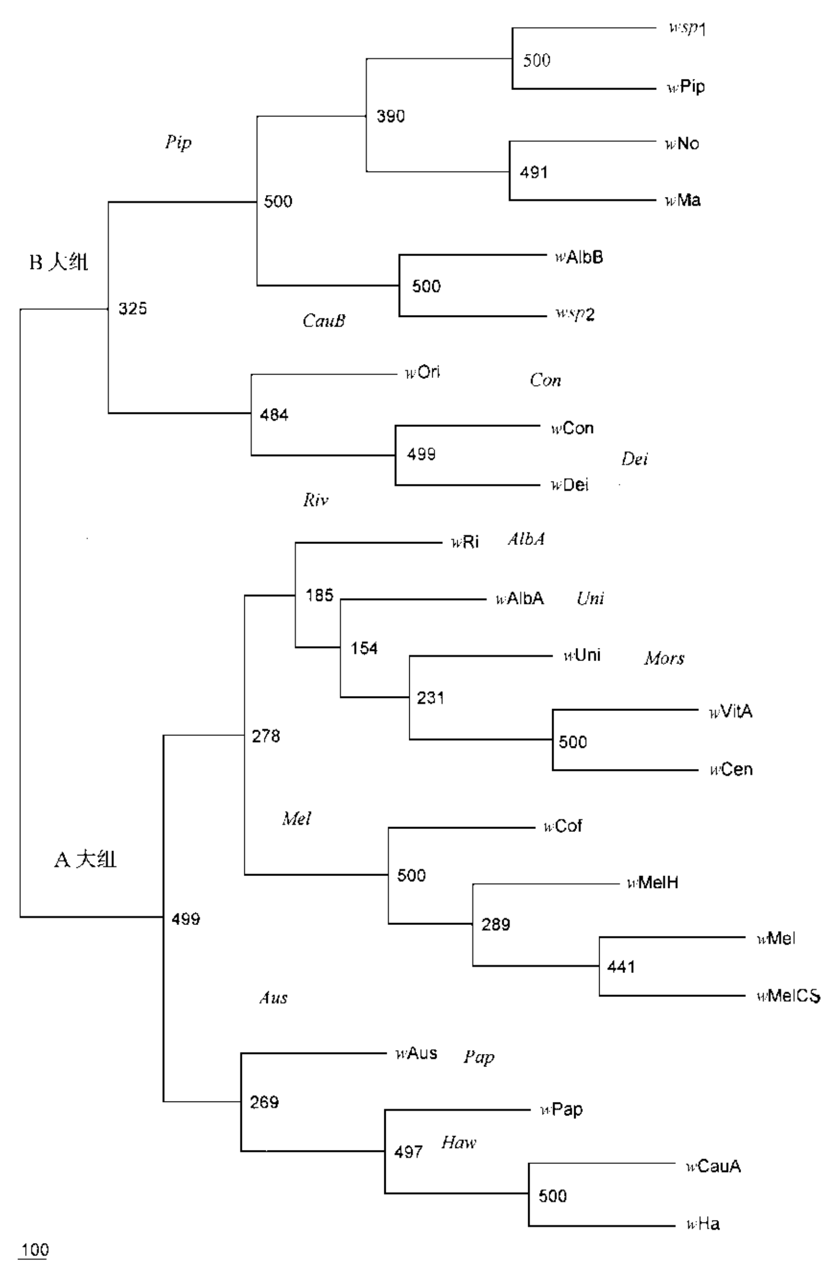


图 2 *wsp* 基因序列聚类分析（UPGMA）的合意树

Fig. 2 Consense tree of *wsp* gene sequences based on UPGMA

节点处数字为 500 次自导复制中该节点存在的次数 The numbers at nodes are the existing times of the nodes in 500 times of bootstrap replication



图3 我国蚊虫体内感染的 *Wolbachia* 株的 *wsp* 基因编码的氨基酸序列及与其他部分株的氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison of the amino acid sequences of the *wsp* gene of *Wolbachia* from infected Chinese mosquitoes with those of other *Wolbachia* strains

序列来源同表1 The amino acid sequences of the other *Wolbachia* strains are acquired from GenBank

参 考 文 献 (References)

Braig H R, Zhou W G, Dobson S L, O'Neill S L, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia*. *J. Bacteriol.*, 180 (9): 2 373 – 2 378.

Felsenstein J, 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. University of Washington, Seattle.

Gan B Y, Zhou W G, Feng L B, Shen D L, Li C B, 2002. Infection of *Wolbachia* in three planthopper species in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45 (1): 14 – 17. [甘波谊, 周伟国, 冯丽冰, 沈大棱, 李昌本, 2002. 沃尔巴克氏体在中国三种稻飞虱中的感染. 昆虫学报, 45 (1): 14 – 17]

Gong P, Shen Z R, Li Z H, 2002. *Wolbachia* endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts. *Acta Entomol. Sin.*, 45 (2): 241 – 252. [龚鹏, 沈佐锐, 李志红, 2002, *Wolbachia* 属共生细菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用. 昆虫学报, 45 (2): 241 – 252]

Song S W, Zhao T Y, Dong Y D, Jiang S N, Lu B L, 2002. Study on the infections of *Wolbachia* in mosquitoes in China. *Chin. J. Vector Biol. Control.*, 13 (1): 19 – 21. [宋社吾, 赵彤言, 董言德, 蒋书楠, 陆宝麟, 2002. 我国蚊虫中昆虫共生微生物 *Wolbachia* 感染的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 13 (1): 19 – 21]

Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22 (22): 4 673 – 4 680.

Werren J H, Wan Z, Li R G, 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 261: 55 – 63.

Werren J H，1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu*. *Rev*. *Entomol*.，42：587－609.

Zhao T Y，Dong Y D，Zhu L H，Lu B L，1998. Hybridization between *Culex pipiens molestus* and other three members of *Culex pipiens* complex in China. *Acta Parasitol*. *Med*. *Entomol*. *Sin*.，5（1）：41－44.［赵彤言，董言德，朱礼华，陆宝麟，1998. 骚扰库蚊与尖音库蚊复合组其它亚种杂交的研究. 寄生虫与医学昆虫学报，5（1）：41－44］

Zhou W G，Rousset F，O'Neill S L，1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc*. *R*. *Soc*. *Lond*. *B*，265：509－515.